



セルロース系バイオマスの酵素糖化プロセスにおける酵素使用量低減と糖化機構に関する研究

著者	上野 義基
発行年	2019-03-25
その他のタイトル	Studies on Saccharification Mechanism of Cellulosic Biomass for Enzyme Loading Reduction in Enzymatic Hydrolysis Process
学位授与番号	17104甲生工第341号
URL	http://hdl.handle.net/10228/00007165

氏名・（本籍）	上野 義基（茨城県）
学 位 の 種 類	博 士（工学）
学 位 記 番 号	生工博甲第 341 号
学位授与の日付	平成 31 年 3 月 25 日
学位授与の条件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	セルロース系バイオマスの酵素糖化プロセスにおける酵素使用量低減と糖化機構に関する研究
論文審査委員会	委員長
	教 授 西田 治男
	〃 白井 義人
	〃 前田 憲成
	〃 河済 博文

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

本論文は再生可能エネルギーであるバイオマスからエタノール等バイオ燃料の原料になる糖の製造における酵素使用量をできる限り少なくし、糖の製造コストの削減につながる研究である。

第1章は緒言であり、以下の内容がまとめられている。すなわち、食糧と競合しないセルロース系バイオマスを原料としたバイオエタノール等の普及のためには、バイオマスの主成分であるセルロースを高効率でグルコースに糖化する技術が必要である。セルロースの糖化技術として微生物が生産した酵素を用いた糖化プロセスの研究が進められているが、酵素コストが実用化の課題となっている。本研究は、酵素の使用量を削減するために、酵素の機能を最大限に発揮する酵素糖化プロセスを開発することを目的として、バイオマスの糖化機構を把握することが目的であることが示されている。

第2章は、第3章から第5章の実験方法を統合して記載されている。

第3章では酵素糖化プロセスにおいて、酵素の使用量を減らすと糖化率が大きく減少する「頭打ち現象」について述べられている。セルロースのモデル物質としてろ紙を使用して検討を行った結果、静置条件で糖化反応を行うことによって、酵素の使用量を大幅に削減すること示されている。また、セルラーゼの結晶領域に作用する2種類の酵素（CBH1 と CBH2）のうち、CBH2 が攪拌ストレスに弱く、短時間で失活することが明らかにされている。ここでは、セルラーゼは複数の酵素から構成される複合酵素であり、各成分酵素の相乗効果によってセルラーゼを分解するため、振とうストレスによる CBH2 の失活によって相乗効果が失われることが「頭打ち現象」の原因であることが明らかにされた。

一方、実バイオマスである水蒸気爆砕処理後のバガスとユーカリには、静置条件の効果は認められなかったが、牛血清アルブミンや乳清(ホエイ)などのタンパク質を添加することによって酵素糖化が促進されることが示された。

第4章では、第3章の検討で、実バイオマスの酵素糖化において疎水性の添加剤が有効であることがわかった。これは、リグニンへの酵素の吸着を抑制しているためと考え、添加剤の機能を検討されている。実バイオマスからリグニンを分離する場合は、酸やアルカリでの処理が必要となり、リグニンの構造や表面性状が変化する可能性があるため、リグニンのモデル物質として疎水性物質であるグラファイトが用いられている。グラファイトは疎水性相互作用によって酵素を吸着し、ろ紙の酵素糖化を阻害することが示された。酵素糖化を促進する添加剤として知られている牛血清アルブミン、ポリエチレングルコール、Tween80の機能を検討した結果、牛血清アルブミンと Tween80 はグラファイトに吸着して疎水性表面を覆うことによって酵素の吸着を抑制しているが、ポリエチレングルコールには、疎水性相互作用による酵素の吸着に対しては効果が無い事が示された。

第5章は分画酵素による相乗効果が検討されている。酵素使用量を削減するためには、セルラーゼ成分酵素の相乗効果が重要であることが第3章の検討で示されたため、市販酵素を分画・精製して得られた酵素セロビオハイドロラーゼ(CBH1 と CBH2)、およびセルロースの非結晶領域に作用するエンドグルカナーゼ(EG1)を用いて、成分酵素の相乗効果が検討された。ろ紙に対しては、CBH1 と CBH2 の相乗効果が強く、糖化反応の途中に片方の酵素を添加しても、初期に混合酵素を添加した場合と同等の糖化率が得られることが示されたが、水蒸気爆砕バガスに対しては、CBH1 と EG1 の相乗効果が強く、EG1 の割合を増やすことで相乗効果が強まることが示された。これらの結果から、基質によって CBH1 と強い相乗効果を示す成分酵素は異なり、基質に適した強い相乗効果を発揮する成分酵素の種類と混合比率を最適化することによって、酵素の使用量を削減できることが示されている。

第6章は酵素使用量の削減につながる酵素糖化機構に関する考察がなされている。第3章の検討でろ紙と水蒸気爆砕処理を行ったバイオマスでは酵素の使用量を削減するための対策が異なることが示された。第4章で酵素を吸着することが確認されたグラファイトを糖化反応中のスラリーに加えた結果、ろ紙の場合は速やかに糖化反応が止まったが、水蒸気爆砕処理を行ったバガスとユーカリは、グラファイトを加えた後も糖化反応が進行した。この結果から、リグニンを含む水蒸気爆砕後のバイオマスでは、糖化反応が進行しているセルロース表面の周囲をリグニンが囲んでおり、酵素に対する振とうストレスの影響が軽減された結果、静置条件による効果が認められなかったと推察された。

第7章では結論として、本研究の結果、セルロースの酵素糖化反応において、多量の酵素が必要となる「頭打ち現象」の対策が明らかにされたこと。また、グラファイトによる添加剤の機能検討やセルラーゼ成分酵素の相互作用の検討の結果は、酵素法糖化プロセスの開発のみならず、商業規模で利用できる安価な添加剤の探索や酵素を生産する微生物の開発の指針として利用され、セルロース系バイオマスの酵素糖化プロセスの実用化に役立つことが期待されること。以上、2点が強調されている。

学位論文審査の結果の要旨

公聴会において出席者から、グラファイトの添加の影響、酵素添加に伴う「頭打ち現象」について、酵素反応モデルからの質問、2種類の類似酵素の挙動、タンパク質濃度の低下と活性の低下の関係、静置における酵素反応の具体的なやり方、酵素コストと全体コストの関係、爆砕法が連続化できることについて、等、様々な質問が与えられたが、すべて論文提出者によって適切に答えられ、質問者の満足を得た。

以上により、論文審査及び最終試験の結果に基づき、審査委員会において慎重に審査した結果、本論文が、博士（工学）の学位に十分値するものであると判断した。